光肩星天牛气味结合蛋白 AglaOBP12 的基因克隆、表达及配体结合特征

李广伟*，陈秀琳，尚天翠

（伊犁师范学院生物与地理科学学院，新疆伊宁 835000）

摘要：【目的】克隆和鉴定光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)基因，明确其表达特点及与寄主植物挥发物的结合特性，有助于阐明光肩星天牛嗅觉识别的分子机制。【方法】根据光肩星天牛雌成虫触角转录组数据，利用 RT-PCR 克隆 *OBP*12 基因，并进行生物信息学分析。通过实时定量 PCR(qRT-PCR)测定 *OBP*12 在光肩星天牛成虫触角、头(移除触角)、胸、腹、足、翅中的转录水平。利用原核表达系统和 Ni 离子亲和层析技术表达和纯化 OBP12 重组蛋白，荧光竞争结合实验测定重组蛋白与 39 种气味配体的结合能力。【结果】获得光肩星天牛气味结合蛋白基因 *AglaOBP*12(GenBank 登录号：KX890109)的完整编码序列，其开放阅读框长 414 bp，编码 137 个氨基酸，N 末端具有 18 个氨基酸组成的信号肽序列，蛋白序列具有 6 个保守的半胱氨酸残基，*AglaOPB*12 属于 Classical OBPs 亚家族基因。qRT-PCR 测定结果表明，*AglaOBP*12 主要在成虫触角中表达，在其他组织微量表达。在待测的 39 种寄主植物挥发物中，重组蛋白 AglaOBP12 仅与 19 种化合物具有结合活性，表明 AglaOBP12 对寄主植物挥发物具有明显的选择结合特性。重组蛋白 AglaOBP12 与十二烷醇、十四烷醇、法尼醇、十二醛、乙酸-顺-3-己烯酯和 β-石竹烯的结合能力较强，结合常数分别为 1.96, 0.96, 1.03, 0.82, 0.77 和 0.74 μmol/L。【结论】明确了 *AglaOBP*12 的核苷酸和氨基酸序列组成，重组 AglaOBP12 蛋白与主链有 12 个碳原子的醇类、醛类和萜烯类挥发物有特异性的结合活性。根据 *AglaOBP*12 基因的表达特点和重组蛋白的结合特性，推测 AglaOBP12 在光肩星天牛成虫定位补充营养寄主植物中发挥重要作用。

关键词：光肩星天牛；气味结合蛋白；嗅觉；基因表达；荧光竞争结合实验

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2017)10-1141-14

cDNA cloning, expression and ligand binding properties of the odorant binding protein AglaOBP12 in the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae)

LI Guang-Wei*, CHEN Xiu-Lin, SHANG Tian-Cui (College of Biology and Geography, Yili Normal University, Yining, Xinjiang 835000, China)

Abstract: 【Aim】Cloning and identification of the odorant binding protein (OBP) genes and clarifying their expression features and ligand-binding characteristics with host-plant volatiles are helpful to address the molecular mechanisms of olfaction in the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis*. 【Methods】Based on the antenna transcriptome data of *A. glabripennis* female adult, the complete coding sequence of *OBP*12 was cloned using RT-PCR and bioinformatically analyzed. The expression levels of *OBP*12 in the antenna, head (without antennae), thorax, abdomen, leg and wing were assayed by real-

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C299)；新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2014S062)

作者简介：李广伟，男，1982 年生，甘肃会宁人，博士，助理研究员，研究方向为农业害虫综合治理，E-mail：xbbjb2010@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：xbbjb2010@sina.com

收稿日期 Received：2017-04-08；接受日期 Accepted：2017-09-05

time quantitative PCR (qRT-PCR). The recombinant OBP12 protein was prokaryotically expressed and then purified by Ni ion affinity chromatography. The binding affinities of the recombinant OBP12 with 39 ligands were assessed by using fluorescent competitive binding assay. 【Results】*AglaOBP*12 of *A. glabripennis* was successfully cloned and sequenced (GenBank accession no.: KX890109). Its ORF is 414 bp in length, encoding 137 amino acids with the signal peptide of 18 amino acids at the N-terminal. The matured protein possessed six conserved cysteines and could be classified into the Classical OBP subfamily. qRT-PCR results showed that *AglaOBP*12 primarily expressed in the antenna and slightly expressed in other tissues. Among the 39 chemicals tested, the recombinant AglaOBP12 had only binding activities to 19 compounds, suggesting that AglaOBP12 has obvious selective binding characteristics to host plant volatiles. The recombinant AglaOBP12 showed higher binding affinities to dodecanol, tetradecanol, farnesol, dodecanal, *cis*-3-hexenyl acetate and β-caryophyllene, with the K_i values of 1.96, 0.96, 1.03, 0.82, 0.77 and 0.74 μmol/L, respectively. 【Conclusion】The nucleotide and deduced amino acid sequences of *AglaOBP*12 were characterized in this study. AglaOBP12 shows particularly strong binding affinities to alcohols, aldehydes and terpenes with 12 carbon atoms in the main-chain. Based on the results of qRT-PCR and fluorescent competitive binding assay, we speculated that AglaOBP12 in the Asian longhorned beetle plays an important role in locating trophic host plants.

Key words: *Anoplophora glabripennis*; odorant binding protein; olfactory; gene expression; fluorescence competitive binding assay

光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*(鞘翅目:天牛科)是我国林木上一种重要的毁灭性蛀干害虫,主要危害杨 *Populus* spp.,柳 *Salix* spp.,槭 *Acer* spp.,榆 *Ulmus* spp. 和胡桃 *Juglans* spp. 等属的多种树种(李国宏等, 2010)。该虫虽然寄主广泛,但成虫对寄主植物有明显的取食和产卵偏好,如嗜食五角枫 *Acer mono* 嫩梢,更偏好在旱柳 *Salix matsudana* 上产卵,灵敏的嗅觉系统在成虫定位补充营养寄主、产卵寄主植物中起着重要作用(Yan *et al*., 2008)。前人已在寄主植物挥发物鉴定、对成虫有电生理活性的挥发物组分的筛选等方面做了大量研究(金幼菊等, 2004; Nehme *et al*., 2010; 范丽清等, 2012, 2013; Meng *et al*., 2014; 杜和芬等, 2016; 王紫薇等, 2016; 朱宁等, 2017)。深入探究光肩星天牛嗅觉相关蛋白基因的生理功能,阐明该虫嗅觉识别的分子机制,将有助于推动光肩星天牛行为调控技术的开发和应用。

气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)能够选择性地结合和运输疏水性的气味分子穿过触角感器淋巴液至位于嗅觉感受神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)树突膜的气味受体(odorant receptors, ORs)上,激活嗅觉信号传导途径,是昆虫感知外界环境的基础(Justice *et al*., 2003; Pelosi *et al*., 2006)。依据序列的同源性可将昆虫 OBPs 分为性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)、普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs)和触角结合蛋白(antennal binding proteins, ABPx)3 类(Hekmat-Scafe *et al*., 2002);根据氨基酸序列中保守半胱氨酸数量可将 OBPs 分为 Classical OBPs, Plus-C OBPs, Dimer OBPs, Minus-C OBPs 和 Atypical OBPs 5 类(Manoharan *et al*., 2013)。随着基因组和转录组测序技术的快速发展,已在鳞翅目、直翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目等 7 个目的多种昆虫触角中鉴定到大量的 OBPs 基因,并利用荧光竞争结合实验测定了 200 多种昆虫 OBPs 的结合功能(Zhou *et al*., 2004; Gong *et al*., 2007; Vandermoten *et al*., 2011; Deng *et al*., 2012; Li *et al*., 2015, 2017; Ahmed *et al*., 2017)。目前,对光肩星天牛嗅觉相关蛋白基因功能的研究甚少。Hu 等(2016)利用转录组测序在光肩星天牛成虫触角中鉴定到 42 种气味结合蛋白,12 种化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs),37 种气味受体(odorant receptors, ORs),2 种嗅觉感受神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)和 14 种气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs);李广伟等(2017a)研究表明,光肩星天牛气味结合蛋白基因除主要在触角中表达外,在头、胸、腹、足、翅的个别组织中也有表达;王菁桢等(2017)鉴定了光肩星天牛性信息素结合蛋白 PBP1 和 PBP2 基因,并对两种 PBPs 基因在成虫身体不同部

位的表达特点进行分析。

基于光肩星天牛触角转录组数据分析，发现触角候选 OBP12 基因在转录组中的 RPKM（每百万个 reads 中来自某基因每千碱基长度的 reads 数，Reads per kilobase per million mapped reads）值相对较高。为了进一步研究 AglaOBP12 的生理功能，本研究首先克隆了该基因的完整编码序列，测定了该基因在成虫不同组织的表达特点，通过异源原核表达和蛋白纯化获得 AglaOBP12 重组蛋白，利用荧光竞争结合实验测定重组蛋白与 39 种气味配体的结合能力，以期加深对光肩星天牛的嗅觉识别机制的了解。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

光肩星天牛幼虫采自新疆伊宁市（采集时间：2016 年 5 月 26 日），寄主植物为五角枫。将受光肩星天牛幼虫危害的五角枫枝干截成 50 ~ 80 cm 的短枝，带回实验室后装入纱网（30 目）系紧袋口并喷水保湿。待成虫羽化后将雌雄分开并置于人工气候箱内饲养，饲养条件：温度 26 ± 1℃，相对湿度 40% ~ 60%，光周期 15L∶9D，成虫以饲喂五角枫嫩枝补充营养。

1.2　主要试剂和仪器

1.2.1　主要试剂：总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus，反转录试剂盒 Reverse Transcriptase M-MLV，Ex Taq DNA 聚合酶，实时荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ，内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ，克隆载体 pMD® 19-T，DNA marker DL2000 和低分子量蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司；感受态细胞 DH5α，BL21（DE3）和表达载体 pET28a（ + ）购自全式金生物科技有限责任公司；His 标签亲和层析柱及填料、免疫印迹化学发光试剂（超灵敏型）购自七海复泰生物科技有限公司；抗 His 标签鼠单克隆抗体购自康为世纪有限公司；羊抗鼠二抗 IgG（H + L）购自 Jackson 公司；荧光探针 N-苯基-1-萘胺（N-phenyl-1-naphthylamine，1-NPN）购自 TCI；39 种挥发物的化学合成品购自 Sigma-Aldrich，Aladdin，Macklin，Alfa 和 TCI 试剂公司，其他无机或有机试剂均为国产或进口分析纯。

1.2.2　主要仪器：PCR 仪（GeneAmp PCR system 9700，Gene limited company）；实时荧光定量 PCR 仪（iQ5，Bio-Rad）；荧光分光光度计（日立 F-4500，日本经营电子电器有限公司）；核酸蛋白浓度测定仪（SimpliNano，GE）；全波长酶标仪（Bio-Tek，Biotek 公司）；UVP 凝胶成像系统（UVP 公司）。

1.3　RNA 提取及 cDNA 模板合成

收集光肩星天牛 5 日龄雌、雄成虫的触角、头部（移除触角）、胸部、腹部、足和翅，其中触角、足和翅各收集 20 对，头和胸各 10 枚，腹 5 枚，每个样品 3 次重复。将收集到的样品立即置于用液氮冷却处理过的小型研钵中研磨，参照 RNAiso Plus（TaKaRa）提供的说明书提取总 RNA，核酸蛋白浓度测定仪测定总 RNA 浓度及 OD_{260}/OD_{280} 值，1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。DNase Ⅰ 除去总 RNA 中的基因组 DNA 后用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第 1 链，－80℃保存备用。

1.4　光肩星天牛气味结合蛋白基因克隆

以光肩星天牛雌虫触角 cDNA 为模板，根据光肩星天牛雌虫触角转录组测序注释到的候选 OBP12 基因序列设计特异性引物（表 1）扩增其完整编码序列，PCR 反应体系和扩增条件参照 Taq DNA Polymerase 试剂盒推荐的方法略有改动。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，将符合预期大小的 DNA 片段纯化、回收后连接到 pMD® 19-T 克隆载体上，然后转化 DH5α 感受态细胞，蓝白斑筛选后随机挑取 5 个阳性菌落至含有 Amp 抗性的 LB 培养基中振荡培养 12 ~ 16 h（37℃，220 r/min），提取质粒 DNA 后送北京奥科生物有限公司测序。

1.5　序列分析

利用在线程序 Open Reading Frame Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）预测气味结合蛋白基因的开放阅读框，利用 Primer Premier 5 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列，SignalP 4.1 Server 在线程序（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测蛋白的信号肽，在线软件 Expasy（http://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白的分子量和等电点，DNAMAN 6.0 软件进行多序列比对。在光肩星天牛 OBP12 与其他昆虫 OBPs 的系统发育进化树构建中，采用 clustalx1.83 进行多序列比对，利用 MEGA6.0.6 软件并采用最大似然法（maximum likelihood，ML）（Bootstrap：1 000 次）构建进化树，最后使用 Figtree v1.4.0 和 Photoshop CS5 软件对系统进化树进行特殊标记。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
OBP12-F1	ATGTCGTCTAGAAGCATTATC	cDNA 克隆
OBP12-R1	TTATACCAGGAACCAGTTCTCC	cDNA cloning
OBP12-tlF1	TAAGGACATCGTACTCGCCG	实时荧光定量 PCR
OBP12-t1R1	CGTCATACATGCAGGCGTTG	qRT-PCR
actin-t1F1	TAGCCATCCAAGCCGTACTC	内参基因扩增
actin-t1R1	GGGTACCGTGTGGGATACAC	Amplification of the reference gene
OBP12-xF1	CG GGATCCAAATTACAACTTCCACCTGATC	蛋白表达
OBP12-xR1	CCC AAGCTTGGGTTATACCAGGAACCAGTTCTC	Expression of protein

下划线分别表示内切酶 *Bam*HⅠ(GGATCC)和 *Hind*Ⅲ(AAGCTT)酶切位点。Restriction sites of *Bam*HⅠ(GGATCC) and *Hind*Ⅲ (AAGCTT) are underlined, respectively.

1.6 光肩星天牛气味结合蛋白基因的表达量分析

利用实时荧光定量 PCR 检测光肩星天牛 *OBP*12 在成虫不同组织的相对表达量,内参基因为光肩星天牛肌动蛋白基因 *Aglaactin*1(登录号:KX660673),qRT-PCR 所用的引物序列见表 1。反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ(2×)10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL,cDNA 模板 2.0 μL,DEPC 水补足至 20 μL。利用三步法标准程序进行扩增:95℃预变性 30 s;95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环,最后在 60~95℃进行熔解曲线分析以排除非特异性 PCR 产物的污染,每个样品 3 次生物学重复、3 次技术重复。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *OBP*12 在不同组织的相对表达量,*OBP*12 在成虫不同组织间的表达量差异用单因素方差分析(Turkey's)进行检验($\alpha=0.05$),在雌雄间的表达量差异用独立样本 T 检验(Independent *t*-test)检测($\alpha=0.05$)。

1.7 光肩星天牛气味结合蛋白的原核表达及纯化

根据光肩星天牛 OBP12 的编码区序列及表达载体 pET28a(+)设计带有 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切位点的引物序列(表 1)。以雌虫触角 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物纯化回收后连接到 pMD® 19-T 克隆载体中,然后转化 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选后挑取阳性菌落振荡培养 12~16 h,提取质粒 DNA 并测序验证。将含有目的片段的重组克隆质粒 DNA 和 pET28a(+)质粒 DNA 分别进行酶切,在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的片段连接到表达载体 pET28a(+)上,再转化到 DH5α 感受态细胞中,用含有卡那霉素的 LB 平板培养基进行筛选,挑取阳性克隆进行培养,小量提取质粒后测序验证。将测序验证正确的重组质粒 pET28a(+)/*AglaOBP*12 转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂板培养后挑取单菌落于 LB 培养液中振荡培养(37℃, 220 r/min, 12~16 h),将小量培养后的菌液按 1∶100(v/v)的比例接种于新鲜的 LB 培养液(含 Kan 50 μg/mL)中,37℃,220 r/min 振荡培养至 $OD_{600}=0.6\sim0.8$ 时,加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG 诱导培养 5 h,然后离心收集菌体,将菌体重新悬浮后超声波破碎,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清和沉淀,SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。重组蛋白的变性和复性,纯化回收,浓度测定及保存参照 Li 等(2016b)的方法进行。

1.8 Western-blot 免疫印迹检测

利用半干法转膜(电流 300 mA,转膜时间 60 min)使重组蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至固相载体 PVDF 膜上。首先用封闭液(TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉)对膜封闭 2 h,然后用 1∶8 000 倍稀释的抗 His 标签鼠单克隆抗体室温封闭 2 h。移弃溶液后用洗脱液 TBST 洗膜 5 次,然后加入 1∶50 000 倍稀释的羊抗鼠二抗室温反应 1 h,用 TBST 洗脱液洗膜 5 次,最后加入免疫印迹化学发光试剂在 UVP 凝胶成像系统中显色观察。

1.9 荧光竞争结合实验

将低温冻存的重组蛋白溶于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液至 2 μmol/L 的测试浓度,荧光探针 1-NPN 和气味标样(即表 2 中的气味配体)用色谱级甲醇溶解至 1 mmol/L 的储存液。荧光分光光度计样品池内安装 1 cm 光通径的四通面石英比色杯(容积 4 mL),发射光与激发光狭缝宽度均设为 10 nm,电压 400 V,激发光波长 337 nm,扫描发射波

长 370 ~ 550 nm。

（1）测定光肩星天牛气味结合蛋白和 1-NPN 的结合常数。首先移取 2 mL 2 μmol/L 的蛋白溶液至石英比色杯中，按 2，4，6，8，10，12，14，16 和 18 μmol/L 的浓度梯度加入 1-NPN 至蛋白与荧光探针的结合达到饱和，分别记录每个梯度下产生的最大荧光强度值，利用荧光值计算蛋白与 1-NPN 的结合常数（$K_{1\text{-NPN}}$）。（2）测定 AglaOBP12 与气味配体的结合常数。向比色皿中加入 2 μmol/L AglaOBP12 蛋白溶液和 2 μmol/L 荧光探针 1-NPN，在相同条件下记录初始荧光值，然后将每种气味标样以终浓度 2，4，6，8，10，14，18 和 22 μmol/L 的梯度（萜烯类物质的浓度梯度：1，2，4，6，8，10 和 12 μmol/L）加入到蛋白和 1-NPN 的混合溶液中，记录荧光强度值。当荧光强度值降低到初始荧光值一半时的配体浓度即为荧光强度中浓度（IC_{50}），利用公式 $K_i = [IC_{50}]/(1+[1-NPN]/K_{1-NPN})$ 计算各气味配体的结合常数，其中［1 − NPN］为未结合的 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-NPN}}$ 为 1-NPN 与 AglaOBP12 蛋白的结合常数。

2　结果

2.1　光肩星天牛气味结合蛋白基因的克隆与序列分析

对光肩星天牛雌虫触角转录组测序和基因功能注释获得的 1 种候选 OBP 基因进行克隆，利用传统 DNA 测序校正了转录组测序和拼接组装中出现的错误碱基，得到了该基因的完整编码序列，命名为 *AglaOBP*12（GenBank 登录号：KX890109）。*AglaOBP*12 的开放阅读框（ORF）长 414 bp，编码 137 个氨基酸，预测分子量为 15.9 kD，等电点为 4.71，氨基酸序列的 N-末端有 18 个氨基酸组成的信号肽序列（图 1）。

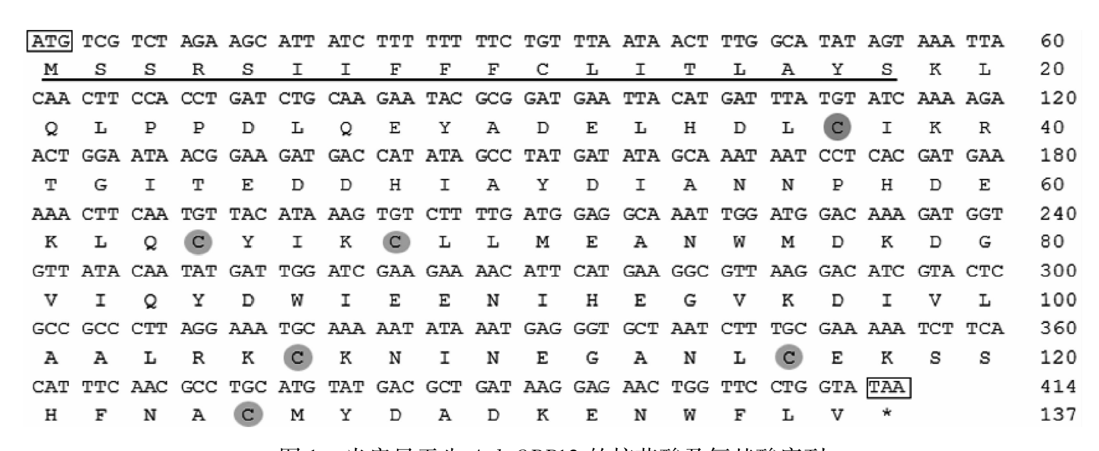


图 1　光肩星天牛 *AglaOBP*12 的核苷酸及氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and amino acid sequences of *AglaOBP*12 in *Anoplophora glabripennis*

预测的信号肽用下划线表示，6 个保守的半胱氨酸残基用灰色底纹的圆圈表示。The predicted signal peptide sequence is underlined, and six conserved cysteines are marked by a circle with gray background.

2.2　AglaOBP12 多序列比对及系统进化分析

AglaOBP12 与天牛科内物种松墨天牛 *Monochamus alternatus*，云斑天牛 *Batocera horsfieldi* 以及其他昆虫 Classical OBPs 的多序列比对发现，AglaOBP12 氨基酸序列具有 6 个保守的半胱氨酸残基，且分布符合 C1-$X_{20\text{-}66}$-C2-X_3-C3-$X_{21\text{-}43}$-C4-$X_{8\text{-}14}$-C5-X_8-C6 和 C1-$X_{15\text{-}39}$-C2-X_3-C3-$X_{21\text{-}44}$-C4-$X_{7\text{-}12}$-C5-X_8-C6（X 为除半胱氨酸以外的其他氨基酸）的特征，AglaOBP12 在序列结构上属于 Classical OBPs 亚家族（图 2）。通过对 AglaOBP12 序列同源性搜索（BlastX）发现，AglaOBP12 与松墨天牛 MaltOBP10 和云斑天牛 BhorOBP2 的氨基酸序列一致性最高，分别达 82% 和 81%；与榆蓝叶甲 *Pyrrhalta aenescens* PaenOBP15 和大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* CbowOBP17 的氨基酸序列一致性也较高，分别达 57% 和 53%，与已知其他昆虫 OBPs 的氨基酸序列一致性较低，均小于 50%。将 AglaOBP12 与其他昆虫的 89 种 OBPs 构建系统进化树发现，所选择的 OBPs 分别聚类到 3 个不同的进化枝，即“Classical OBPs”，“Minus-C OBPs”和“Plus-C OBPs”进化枝。本实验克隆的 AglaOBP12 与 BhorOBP3，DarmOBP2，DhelOBP13，DponOBP2，DponOBP3，DponOBP6，MaltOBP10，PaenOBP15 等 37 种 Classical OBPs 聚类到同一个独立的进化枝，表明它们之间在进化关系上更加同源（图 3）。

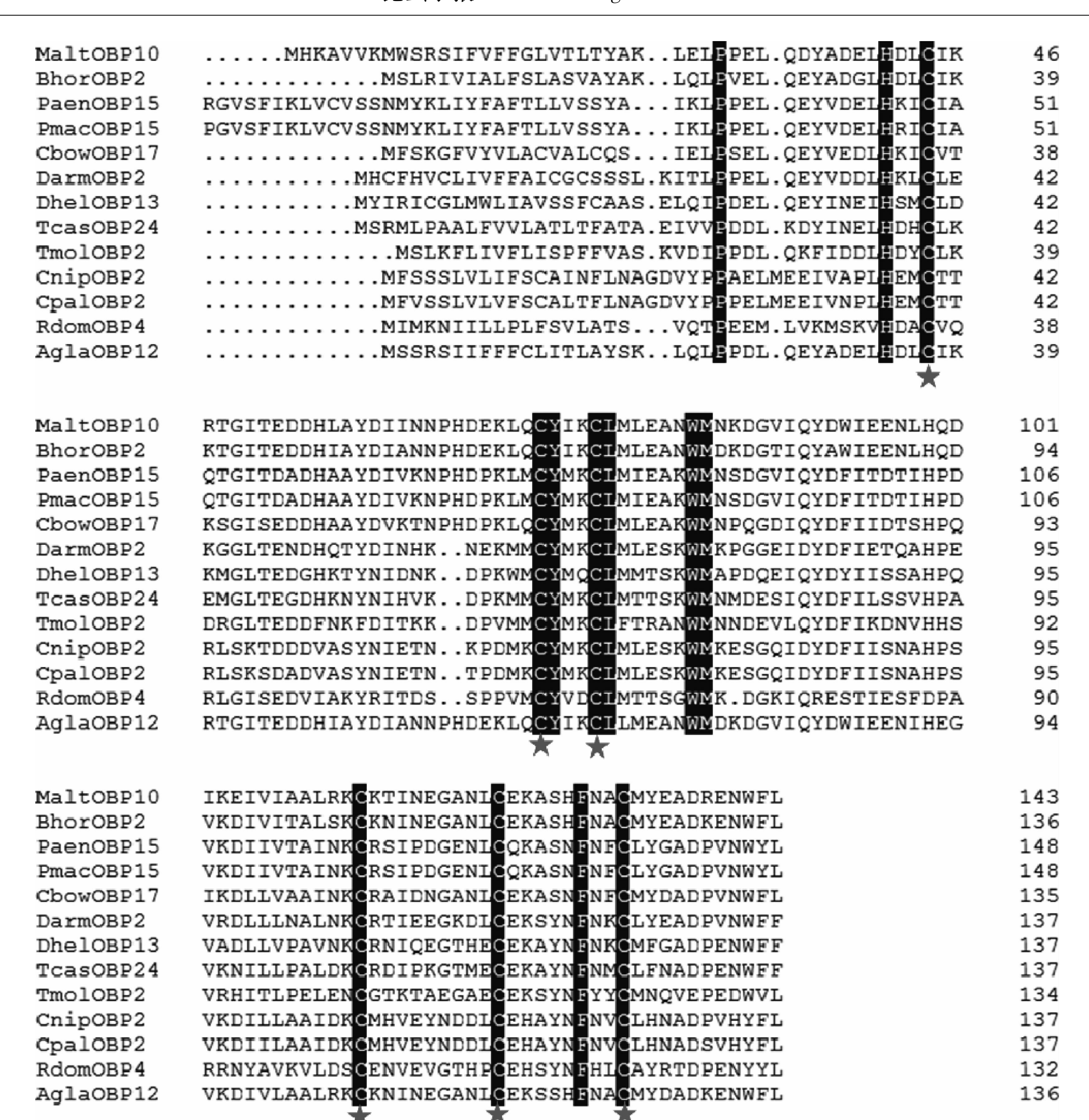


图 2 AglaOBP12 与其他昆虫 Classical OBPs 的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of AglaOBP12 with classical OBPs from other insect species

星号表示保守位点的半胱氨酸残基 The conserved cysteines are indicated with asterisks. 气味结合蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of odorant binding proteins and their GenBank accession numbers：松墨天牛 *Monochamus alternatus*（MaltOBP10，AIX97025.1）；云斑天牛 *Batocera horsfieldi*（BhorOBP2，AHA33380.1）；榆蓝叶甲 *Pyrrhalta aenescens*（PaenOBP15，APC94288.1）；榆黄叶甲 *Pyrrhalta maculicollis*（PmacOBP15，APC94206.1）；大猿叶甲 *Colaphellus bowringi*（CbowOBP17，ALR72505.1）；华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi*（DarmOBP2，AIY61045.1）；花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides*（DhelOBP13，AIX97059.1）；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（TcasOBP24，EFA04747.2）；黄粉虫 *Tenebrio molitor*（TmolOBP2，AJM71476.1）；日本通草蛉 *Chrysoperla nipponensis*（CnipOBP2，AKW47223.1）；大草岭 *Chrysopa pallens*（CpalOBP2，AKW47195.1）；谷蠹 *Rhyzopertha dominica*（RdomOBP4，AIX97145.1）；光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*（AglaOBP12，KX890109）.

2.3 *AglaOBP*12 基因在成虫不同组织的表达量分析

为了解 *AglaOBP*12 基因的可能功能，利用 qRT-PCR 测定了 *AglaOBP*12 在雌雄成虫不同组织的 mRNA 转录水平（图 4）。结果表明，*AglaOBP*12 除在雌虫腹部未检测到荧光信号外，在其他组织均有表达，但在触角中的表达量最高，显著高于其他组织。*AglaOBP*12 在雌虫触角中的表达量分别是头、胸、足和翅部表达量的 555，87 275，4 359 和 1 446 倍，在雄虫触角中的表达量分别是头、胸、腹、足和翅部表达量的 891，9 484，6 371，269 和 942 倍。*AglaOBP*12 在雌雄虫触角（P = 0.109）、翅（P = 0.453）中的表达量差异不显著，在雌虫头部的表达量显著高于雄虫（P = 0.000），在雄虫足中的表达量显著高于雌虫（P = 0.010）。

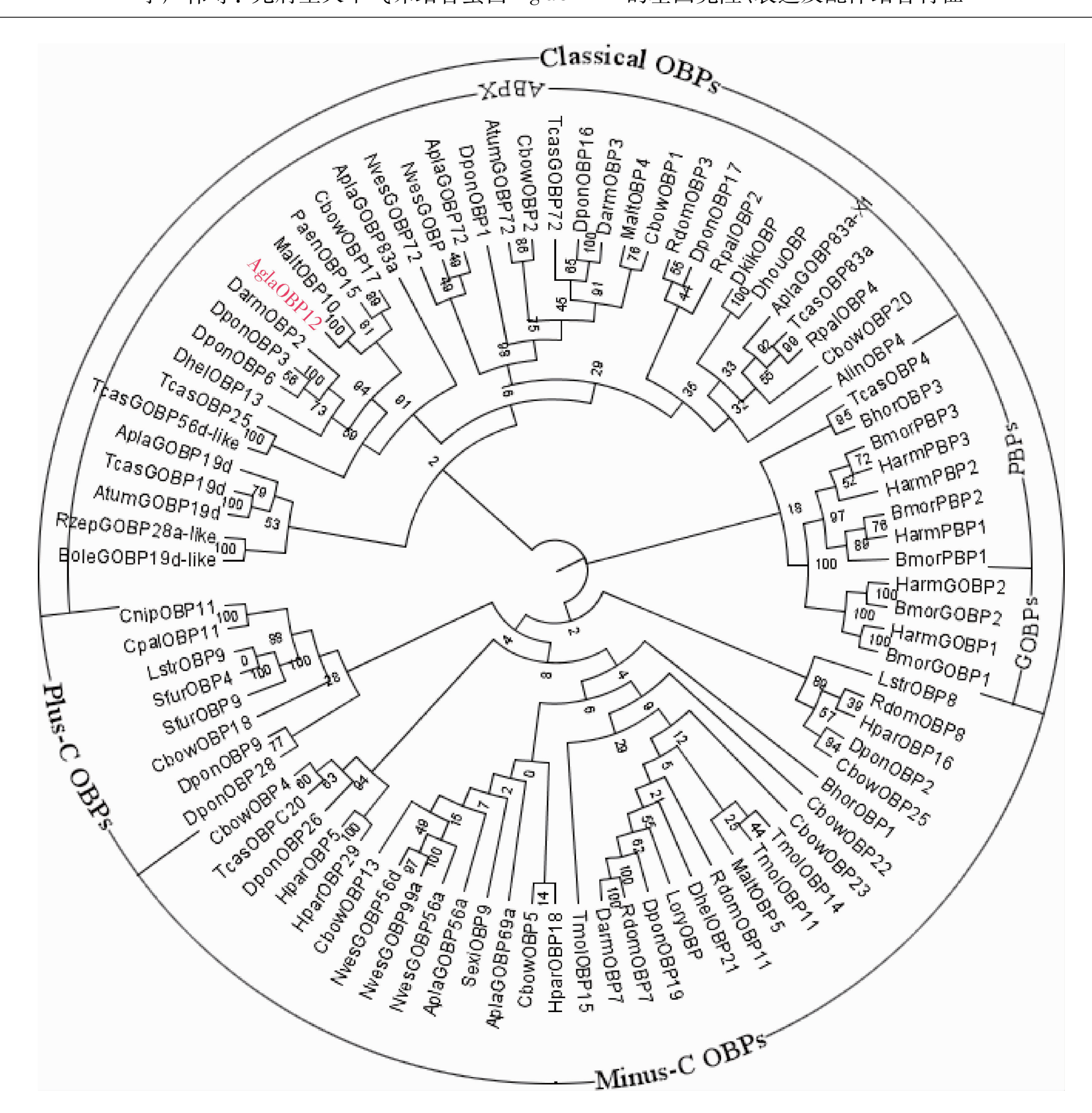


图 3　AglaOBP12 与其他昆虫 OBPs 的系统进化树构建

Fig. 3　Construction of phylogenetic tree of AglaOBP12 and OBPs from other insects

OBPs 序列的来源物种 Origin species of OBPs sequences：AlinOBP4：苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*；AplaGOBP83a-X1，AplaGOBP83a，AplaGOBP72，AplaGOBP19d，AplaGOBP69a，AplaGOBP56d：白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis*；AtumGOBP72，AtumGOBP19d：小蜂窝甲虫 *Aethina tumida*；BhorOBP1，BhorOBP3：云斑天牛 *Batocera horsfieldi*；BoleGOBP19d-like：橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae*；BmorGOBP1，BmorGOBP2，BmorPBP1，BmorPBP2，BmorPBP3：家蚕 *Bombyx mori*；CbowOBP1，CbowOBP2，CbowOBP4，CbowOBP5，CbowOBP13，CbowOBP17，CbowOBP18，CbowOBP20，CbowOBP22，CbowOBP23，CbowOBP25：大猿叶甲 *Colaphellus bowringi*；CnipOBP11：日本通草蛉 *Chrysoperla nipponensis*；CpalOBP11：大草蛉 *Chrysopa pallens*；DarmOBP2，DarmOBP3，DarmOBP7：华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi*；DhelOBP13：花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides*；DhouOBP：云南松毛虫 *Dendrolimus houi*；DkikOBP：思茅松毛虫 *Dendrolimus kikuchii*；DponOBP1，DponOBP2，DponOBP3，DponOBP6，DponOBP9，DponOBP16，DponOBP17，DponOBP19，DponOBP26，DponOBP28：山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*；HarmGOBP1，HarmGOBP2，HarmPBP1，HarmPBP2，HarmPBP3：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；HparOBP5，HparOBP16，HparOBP18，HparOBP29：暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*；LoryOBP：稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus*；LstrOBP，LstrOBP8，LstrOBP9：灰飞虱 *Laodelphax striatellus*；MaltOBP4，MaltOBP5，MaltOBP10：松墨天牛 *Monochamus alternatus*；NvesGOBP72，NvesGOBP lush-like，NvesGOBP56d，NvesGOBP99a，NvesGOBP56a：大红埋葬甲 *Nicrophorus vespilloides*；PaenOBP15：榆蓝叶甲 *Pyrrhalta aenescens*；RdomOBP3，RdomOBP7，RdomOBP8，RdomOBP11：谷蠹 *Rhizopertha dominica*；RaplOBP2，RaplOBP4：棕榈象甲 *Rhynchophorus palmarum*；SexiOBP9：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*；SfurOBP4，SfurOBP9：白背飞虱 *Sogatella furcifera*；TcasOBP4，TcasOBPC20，TcasOBP25：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；TmolOBP11，TmolOBP14，TmolOBP15，TmolGOBP83a，TmolGOBP56-like，TmolGOBP72，TmolGOBP19d：黄粉虫 *Tenebrio molitor*. 采用最大似然法（Bootstrap：1 000 次）构建进化树。Phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood (ML) method (bootstrap: 1 000).

2.4　重组蛋白 AglaOBP12 的表达及纯化

从图 5（A）可以看出，重组表达质粒 pET28a（+）/*AglaOBP*12 转入感受态细胞 BL21（DE3）后在 IPTG 的诱导下成功表达，SDS-PAGE 检测发现重组蛋白主要以包涵体的形式存在。纯化的重组蛋白在凝胶上显示得到大小约 16 kD 的单一条带（图 5：

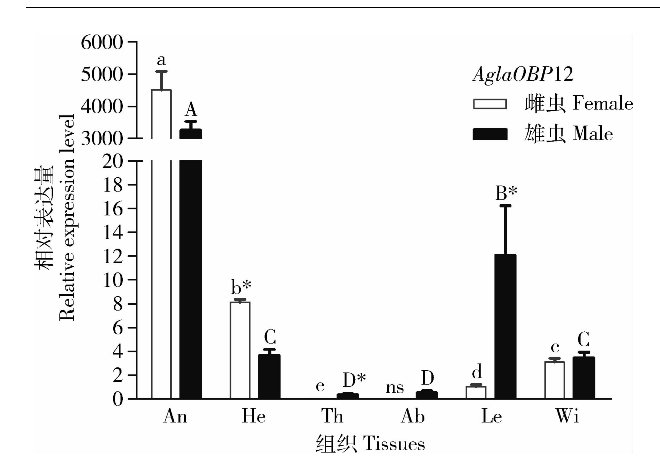


图 4 *AglaOBP*12 在光肩星天牛成虫不同组织中的表达量

Fig. 4 Expression levels of *AglaOBP*12 in different tissues of *Anoplophora glabripennis* adults

An: 触角 Antenna; He: 头 Head; Th: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; Le: 足 Leg; Wi: 翅 Wing. 小写字母和大写字母分别表示雌虫和雄虫不同组织间的表达量差异显著(Tukey's 检验, $\alpha = 0.05$)。星号表示同一组织雌雄虫之间的表达量差异显著(独立样本 t 检验, $\alpha = 0.05$). Different lowercase and capital letters indicate significantly different expression levels among different tissues of the female and male, respectively (Tukey's test, $\alpha = 0.05$). Asterisk indicates significantly different expression levels of *AglaOBP*12 between two sexes in the same tissue (Independent t-test, $\alpha = 0.05$).

A, 5 泳道), 表明获得了较高纯度的融合蛋白。Western blot 免疫印迹检测也表明在相应位置产生特异性条带,说明此特异条带为目的条带(图 5: B)。

2.5 AglaOBP12 与气味配体的结合能力

重组 AglaOBP12 蛋白在 337 nm 激发光波长下自身无明显的内源荧光信号,当以 2 μmol/L 的浓度梯度逐次加入1-NPN溶液时在400 ~ 410 nm处产生强烈的荧光光谱。荧光强度值的增幅随加入 1-NPN 浓度的不断增大而逐渐减小,最终蛋白和 1-NPN 的结合达到饱和,通过结合曲线和 Scatchard 方程计算出 AglaOBP12 与 1-NPN 的结合常数为 3.25 μmol/L(图 6)。

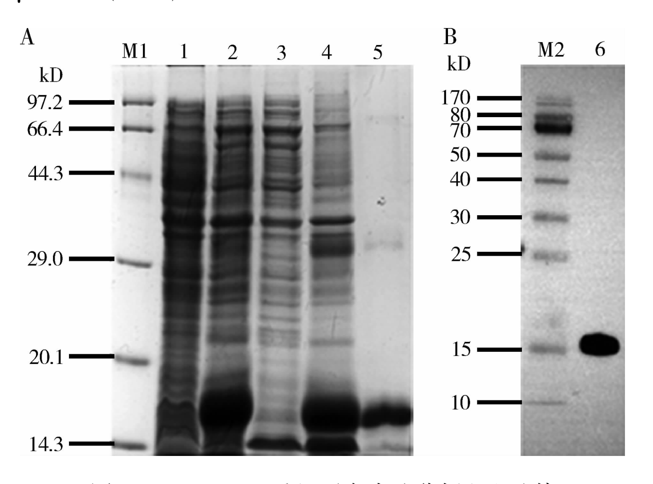


图 5 AglaOBP12 重组蛋白表达分析(A)及其 Western blot 验证(B)

Fig. 5 Expression analysis (A) and Western-blot (B) of recombinant AglaOBP12

M1, M2: 蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker; 1: 未经 IPTG 诱导的 pET28a(+)/*AglaOBP*12 表达产物 Expressed product of pET28a(+)/*AglaOBP*12 without induction with IPTG; 2: 经 IPTG 诱导的 pET28a(+)/*AglaOBP*12 表达产物 Expressed product of pET28a(+)/*AglaOBP*12 induced by IPTG; 3: 上清中的 pET28a(+)/*AglaOBP*12 表达产物 Expressed product of pET28a(+)/*AglaOBP*12 in supernatant; 4: 包涵体中的 pET28a(+)/*AglaOBP*12 表达产物 Expressed product of pET28a(+)/*AglaOBP*12 in inclusion bodies; 5: 纯化的 AglaOBP12 重组蛋白 Purified recombinant AglaOBP12; 6: 纯化的融合蛋白 Western bolt 检测 Purified fusion protein detected by Western blot.

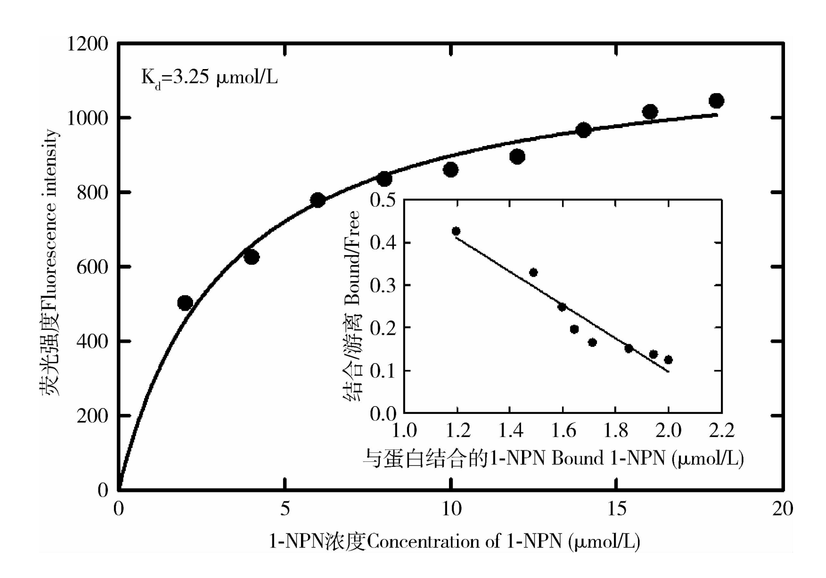


图 6 AglaOBP12 与 1-NPN 的结合曲线及 Scatchqrd 方程

Fig. 6 Binding curve and Scatchard plot of the recombinant AglaOBP12 to 1-NPN

用于荧光竞争结合实验的 39 种气味标样中，仅有 19 种化合物能将 1-NPN 探针从 AglaOBP12 蛋白溶液中替换 50% 以上，表明 AglaOBP12 的结合谱较窄，与气味物质的结合具有明显的选择性（表 2）。在醇类物质中，AglaOBP12 与十二烷醇、十四烷醇和法尼醇的结合能力最强，结合常数分别为 1.96、0.96 和 1.03 μmol/L。此外，AglaOBP12 与橙花叔醇也有较强的结合活性，结合常数为 5.81 μmol/L，

表 2　利用荧光竞争结合实验测定的重组蛋白 AglaOBP12 与候选配体的结合能力

Table 2　Binding affinities of the recombinant AglaOBP12 to candidate ligands assessed by fluorescent competitive binding assays

气味配体 Ligands	分子量 Molecular weight	分子式 Formula	纯度（%） Purity	IC_{50} （μmol/L）	K_i （μmol/L）
异戊醇 Isoamyl alcohol	88.15	$C_5H_{12}O$	>99.0（GC）	–	–
顺-3-己烯-1-醇 *Cis*-3-Hexen-1-ol	100.16	$C_6H_{12}O$	98.0（AR）	–	–
己醇 1-Hexanol	102.18	$C_6H_{14}O$	>98.0（AR）	–	–
异辛醇 Isooctanol	130.23	$C_8H_{18}O$	>99.0（GC）	–	–
癸醇 1-Decanol	158.28	$C_{10}H_{22}O$	>99.5（GC）	18.79 ±0.80	14.37
十二烷醇 1-Dodecanol	186.34	$C_{12}H_{26}O$	>98.0（GC）	2.56 ±0.15	1.96
十四烷醇 1-Tetradecanol	214.39	$C_{14}H_{30}O$	95.0	1.25 ±0.20	0.96
苯甲醇 Benzyl alcohol	108.14	C_7H_8O	>99.5（GC）	21.84 ±3.06	16.70
芳樟醇 Linalool	154.25	$C_{10}H_{18}O$	>98.0（GC）	–	–
橙花叔醇 Nerolidol	222.37	$C_{15}H_{26}O$	97.0	7.60 ±0.34	5.81
法尼醇 Farnesol	222.37	$C_{15}H_{26}O$	95.0	1.35 ±0.18	1.03
反-2-己烯醛（*E*）-2-Hexenal	98.15	$C_6H_{10}O$	98.0（AR）	–	–
己醛 Hexanal	100.16	$C_6H_{12}O$	>95.0（AR）	9.30 ±0.38	7.11
庚醛 Heptanal	114.18	$C_7H_{14}O$	97.0（AR）	11.60 ±0.63	8.87
壬醛 Nonanal	142.24	$C_9H_{18}O$	95.0（AR）	–	–
癸醛 Decanal	156.26	$C_{10}H_{20}O$	97.0（AR）	25.54 ±2.35	19.53
十二醛 Dodecanal	184.32	$C_{12}H_{24}O$	95.0	1.07 ±0.28	0.82
十四醛 Tetradecanal	184.28	$C_{11}H_{20}O_2$	98.0	–	–
苯甲醛 Benzaldehyde	106.12	C_7H_6O	≥99.5（GC）	–	–
丙酸丁酯 Butyl propionate	130.18	$C_7H_{14}O_2$	99.0（GC）	20.83 ±0.45	15.93
甲酸-顺-3-己烯酯 *Cis*-3-Hexenyl formate	128.17	$C_7H_{12}O_2$	>95.0	13.15 ±0.44	10.06
乙酸-顺-3-己烯酯 *Cis*-3-Hexenyl acetate	142.20	$C_8H_{14}O_2$	>97.0（GC）	1.00 ±0.17	0.77
乙酸己酯 Hexyl acetate	144.21	$C_8H_{16}O_2$	99.0（AR）	–	–
乙酸辛酯 Octyl acetate	172.26	$C_{10}H_{20}O_2$	98.0	9.62 ±0.45	6.75
己酸丁酯 Butyl hexanoate	172.27	$C_{10}H_{20}O_2$	≥99.5（GC）	5.87 ±0.16	4.12
十四酸甲酯 Methyl tetradecanoate	242.40	$C_{15}H_{30}O_2$	>98.0（GC）	–	–
十六酸甲酯 Methyl hexadecanoate	270.45	$C_{17}H_{34}O_2$	>99.0（GC）	–	–
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	152.15	$C_8H_8O_3$	≥99.0（GC）	–	–
茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate	224.30	$C_{13}H_{20}O_3$	98.0（AR）	7.21 ±0.54	5.06
α-蒎烯 α-Pinene	136.23	$C_{10}H_{16}$	98.0（AR）	–	–
（*E*,*E*）-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯 （*E*,*E*）-2,6-Dimethyl-2,4,6-Octatriene	136.23	$C_{10}H_{16}$	98.0（AR）	11.03 ±0.75	7.74
α-罗勒烯 α-Ocimene	136.23	$C_{10}H_{16}$	≥90.0（AR）	10.85 ±0.56	7.61
（–）-莰烯（–）-Camphene	136.23	$C_{10}H_{16}$	95.0	–	–
β-石竹烯 β-Caryophyllene	204.35	$C_{15}H_{24}$	>90.0（GC）	1.06 ±0.19	0.74
苯甲腈 Benzonitrile	103.12	C_7H_5N	>99.0（AR）	–	–
柠檬腈 Lemonile	149.23	$C_{10}H_{15}N$	97.0	–	–
十二烷 Dodecane	170.33	$C_{12}H_{26}$	>99.0（GC）	–	–
十三烷 Tridecane	184.36	$C_{13}H_{28}$	98.0	–	–
十五烷 Pentadecane	212.41	$C_{15}H_{32}$	99.0	–	–

IC_{50}：配基替换 50% 荧光探针 1-NPN 时的浓度，以 3 次重复试验的平均值 ± 标准误表示。The concentration of ligand displacing half of the florescent 1-NPN, which is represented by the mean ± *SE* of three replicates. –：无法计算出 IC_{50}（The IC_{50} value was not calculable）；K_i：结合常数 Binding constant.

与癸醇和苯甲醇的结合能力较弱，与其他 5 种醇类物质没有结合活性（图 7：A）。在待测的 8 种醛类物种中，AglaOBP12 与十二醛的结合能力最强，结合常数为 0.82 μmol/L，与己醛和庚醛也有较强的结合活性，结合常数分别为 7.11 和 8.87 μmol/L，与其他物质的结合能力较弱（图 7：B）。在供试的 10 种酯类物质中，AglaOBP12 与乙酸-顺-3-己烯酯、乙酸辛酯、己酸丁酯和茉莉酸甲酯的结合能力最强，结

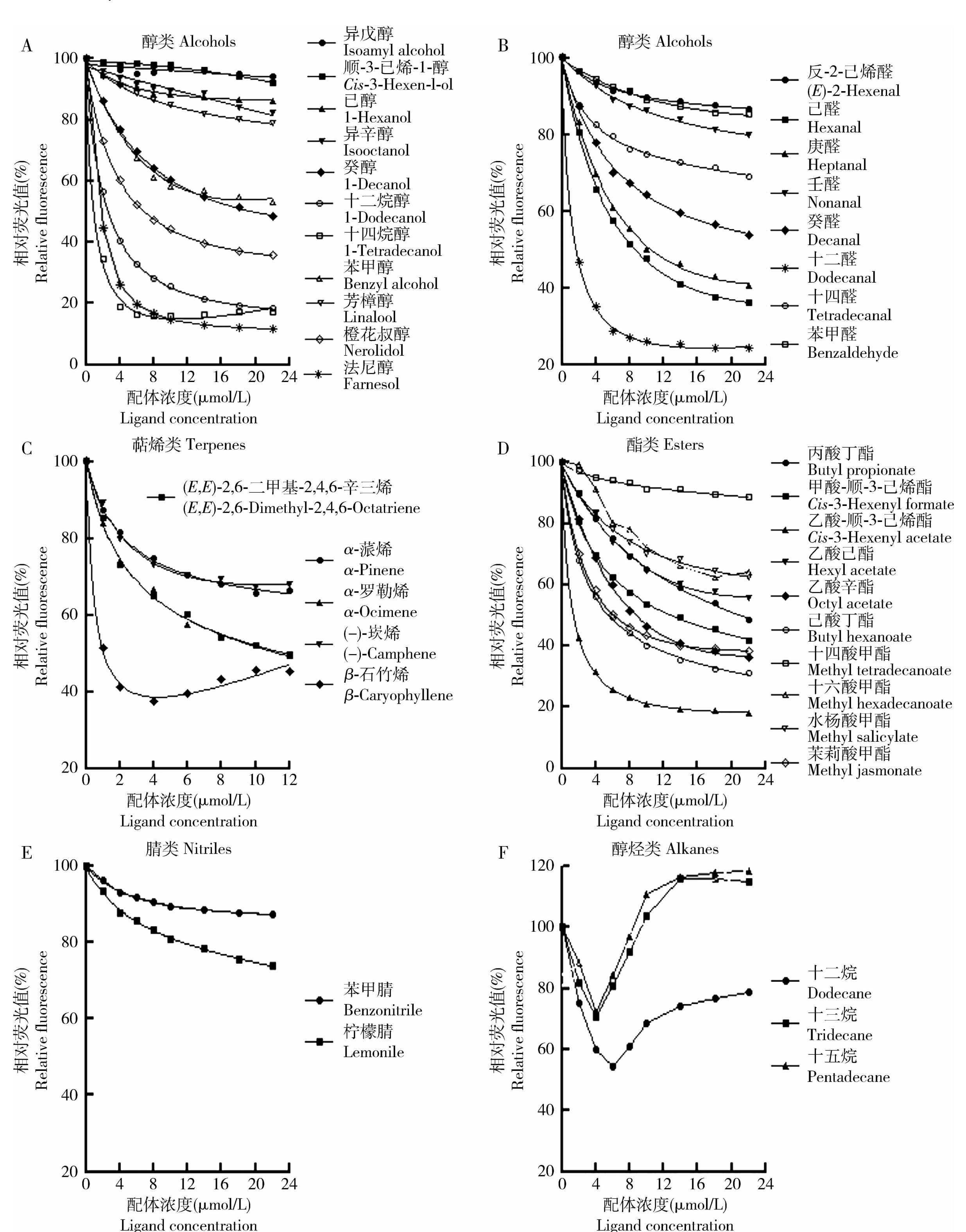


图 7 寄主植物挥发物与 1-NPN 竞争结合重组蛋白 AglaOBP12

Fig. 7 Competitive binding of host plant volatiles with 1-NPN to the recombinant AglaOBP12

合常数分别为 0.77, 6.75, 4.12 和 5.06 μmol/L (图 7：D)。在供试的 5 种萜烯类物质中，AglaOBP12 与 β-石竹烯的结合活性最强，与(*E*,*E*)-2,6-二甲基-2,4-6-辛三烯和 α-罗勒烯具有中等强度的结合能力，但对其同分异构体 α-蒎烯和(－)-崁烯没有结合活性，表明萜烯类物质的空间构型影响蛋白对配体的结合(图 7：C)。AglaOBP12 不与苯甲腈、柠檬腈、十二烷、十三烷和十五烷结合，表明腈类物质和脂肪烃不是 AglaOBP12 的有效配体(图 7：E, F)。

3　结论与讨论

本研究基于光肩星天牛触角转录组数据，克隆了一个气味结合蛋白基因 *AglaOBP*12，序列分析表明 *AglaOBP*12 基因编码的氨基酸序列有 6 个保守的半胱氨酸残基，N-末端有由 18 个氨基酸组成的信号肽序列，在系统进化树中 *AglaOBP*12 与其他昆虫的 Classical OBPs 聚类到同一进化枝，表明 *AglaOBP*12 属于 Classical OBPs 亚家族基因。在鳞翅目昆虫中，根据 OBPs 序列的同源性可将 Classical OBPs 分为 PBPs, GOBPs 和 ABPX 三类，并可借助 OBPs 基因的表达特点、免疫定位和蛋白的结合特性进行验证(Vogt *et al.*, 1991; Laue *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 2012)。在鞘翅目昆虫中，Classical OBPs 基因种类相对较少，已发掘的基因资源相对不足，目前对 Classical OBPs 的进一步分类相对困难。如此次构建进化树所选的大红埋葬虫 *Nicrophorus vespilloides* NvesGOBP56a, NvesGOBP56d 和 NvesGOBP99a，以及白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* AplaGOBP56a (Duan *et al.*, 2015)在序列结构组成上均属于 Minus-C OBPs，但却被归为 GOBPs 亚家族。根据 AglaOBP12 在雌雄虫触角中的表达特点、进化聚类关系以及与气味配体的结合特性，推测 AglaOBP12 属于 Classical OBPs 中的 ABPX 亚家族基因，AglaOBP12 蛋白可能在成虫定位补充营养寄主的信息识别中发挥作用。

由于光肩星天牛成虫对寄主植物有明显的选择取食特性，本试验主要选择了嗜食寄主植物五角枫、旱柳、小叶杨 *Populus simonii* 等的 39 种挥发物的气味标样进行测试。测试结果表明，AglaOBP12 的气味结合谱较窄，仅能结合被测试的 39 种挥发物中的 19 种化合物，包括醇、醛、酯和萜烯类物质，但不能结合烷烃和腈类物质，表明气味配体的官能团影响气味分子与 AglaOBP12 的有效结合。有不少研究认为，气味分子的碳原子数影响配体与蛋白的结合能力，在一定范围类，随着碳原子数的增加，配体与重组蛋白的结合能力逐渐减弱(Li *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012)，也有研究认为气味配体的结合能力与配体的碳原子个数之间无明显线性关系(Li *et al.*, 2016b; 房迟琴等, 2016; 覃江梅等, 2016)。荧光竞争结合实验表明 AglaOBP12 对气味配体的结合能力与主链碳原子数之间无明显的相关关系，如 AglaOBP12 既能与己醛(C6)、乙酸-顺-3-己烯酯(C8)等碳原子数较少的气味配体结合，也能与十四烷醇(C14)、橙花叔醇(C15)、法尼醇(C15)等碳原子数较多的气味配体结合，但 AglaOBP12 对主链在 C10～C14 的气味配体有较强烈的结合活性，如十二烷醇、十四烷醇、法尼醇、橙花叔醇、十二醛、乙酸丁酯和 β-石竹烯等。此外，配体的空间构象也影响 AglaOBP12 的结合能力，如 α-蒎烯、(*E*,*E*)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯、α-罗勒烯和(－)-崁烯属镜像异构体，(*E*,*E*)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯和 α-罗勒烯与 AglaOBP12 表现出中等程度的结合活性，而 α-蒎烯和(－)-崁烯不能与重组蛋白结合。气味结合蛋白具有由 6 个 α 螺旋组成的疏水性结合口袋，气味配体能否进入结合口袋内部主要取决于气味配体的碳链长度和气味分子的极性。气味配体进入 OBPs 结合口袋后能否与蛋白有效结合，与气味配体能否与结合口袋内的某些氨基酸残基形成稳定的化学键有关。如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* lush 蛋白与乙醇(Thode *et al.*, 2008)，家蚕 *Bombyx mori* BmorPBP1 与蚕蛾醇(Sandler *et al.*, 2000)，烟草天蛾 *Manduca sexta* MsexGOBP2 与(6*E*, 11*Z*)-Hexadecadienyl diazoacetate (Feng and Prestwich, 1997)，冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* AgamOBP7 与避蚊胺(Tsitsanou *et al.*, 2012)，东亚飞蝗 *Locusta migratoria* LmigOBP1 与十五烷醇(Jiang *et al.*, 2009)，以及梨小食心虫 *Grapholita molesta* GmolGOBP2 与十二烷醇(Li *et al.*, 2016a)能够特异性结合，是由于结合腔内特定的亲水性残基－OH 或－NH_2 能与气味配体的羟基或羰基形成氢键，从而使蛋白与配体之间表现出强烈的特异性结合。AglaOBP12 与主链有 10～14 个碳原子的醇、醛类挥发物之所以强烈结合，推测其与结合腔内的亲水性残基形成的氢键有关，具体的结合机制还需解析 AglaOBP12 与配体复合物的晶体结构或通过同源建

模、分子柔性对接和定点突变技术进行验证。

乙酸-顺-3-己烯酯、橙花叔醇、法尼醇和 β-石竹烯是光肩星天牛嗜食寄主五角枫的主要挥发物(李广伟等, 2017b),对成虫有明显的电生理反应和行为活性,这些气味物质与 AglaOBP12 表现出强烈的结合活性。顺-3-己烯-1-醇、正己醇、芳樟醇、反-2-己烯醛、α-蒎烯、(-)-崁烯和十二烷是五角枫和旱柳的主要挥发物组分,部分化合物已证明对成虫有引诱作用(范丽清等, 2012, 2013; 李硕等, 2016),但与 AglaOBP12 未表现出明显的结合活性,推测这些化合物是由光肩星天牛的其他 OBPs 识别,光肩星天牛在寄主植物挥发物的识别过程中需要多种 OBPs 的协同配合(房迟琴等, 2016)。β-石竹烯是光肩星天牛主要寄主植物共有的挥发物,其单体化合物或与聚集信息素的联合混配物均对光肩星天牛有诱捕效果, 在供试的 39 种气味配体中, AglaOBP12 与 β-石竹烯的结合能力最强, 推测 AglaOBP12 是识别 β-石竹烯的重要气味结合蛋白。(*Z*)-9-二十三烯,(*Z*)-9-二十五烯,(*Z*)-7-二十五烯,(*Z*)-9-二十七烯和(*Z*)-7-二十七烯是光肩星天牛雌性接触性信息素成分(Zhang *et al*., 2003),由于未购得以上化合物的标准品,此次试验没有测定 AglaOBP12 与性信息素组分的结合能力, 故 AglaOBP12 是否具有 PBPs 的生理功能还有待进一步研究。根据 *AglaOBP*12 基因在成虫触角中高丰度表达的特点以及重组蛋白与寄主植物挥发物的结合特性,表明 AglaOBP12 在光肩星天牛成虫的嗅觉通讯中发挥着重要作用。

参考文献(References)

Ahmed T, Zhang T, Wang Z, He K, Bai S, 2017. Molecular cloning, expression profile, odorant affinity, and stability of two odorant-binding proteins in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 92(2): e21347.

Deng SS, Yin J, Zhong T, Cao YZ, Li KB, 2012. Function and immunocytochemical localization of two novel odorant-binding proteins in olfactory sensilla of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chem. Senses*, 37(2): 141-150.

Du HF, Wang PX, Xu HC, Zhang WW, Wang ZW, 2016. EAG responses of asian longhorn beetle *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) to volatiles of hickory. *J. Zhejiang A&F Univ*., 33(1): 166-171. [杜和芬, 王佩星, 徐华潮, 张娓娓, 王紫薇, 2016. 光肩星天牛对山核桃挥发物组分的触角电位分析. 浙江农林大学学报, 33(1): 166-171]

Duan J, Ladd T, Doucet D, Cusson M, vanFrankenhuyzen K, Mittapalli O, Krell PJ, Quan GX, Zhu KY, 2015. Transcriptome analysis of the emerald ash borer (EAB), *Agrilus planipennis*: *de novo* assembly, functional annotation and comparative analysis. *PLoS ONE*, 10(8): e0134824.

Fan LQ, Yan SC, Cheng H, Sun ZH, 2012. Antennal activity and EAG responses of Asian longhorn beetle *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) to plant terpenes. *J. Northeast Forest. Univ*., 40(11): 143-146. [范丽清, 严善春, 程红, 孙宗华, 2012. 光肩星天牛对寄主植物萜烯类化合物触角活性和电位反应. 东北林业大学学报, 40(11): 143-146]

Fan LQ, Yan SC, Sun ZH, Meng ZJ, 2013. EAG and behavioral responses of Asian longhorn beetle *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Chin. J. Ecol*., 32(1): 142-148. [范丽清, 严善春, 孙宗华, 孟昭君, 2013. 光肩星天牛对植物源挥发物的触角电位和行为反应. 生态学杂志, 32(1): 142-148]

Fang CQ, Zhang XX, Liu DD, Li KB, Zhang S, Cao YZ, Fan D, Yin J, 2016. Cloning and functional analysis of an odorant-binding protein HparOBP15a gene from *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Entomol. Sin*., 59(3): 260-268. [房迟琴, 张鑫鑫, 刘丹丹, 李克斌, 张帅, 曹雅忠, 樊东, 尹姣, 2016. 暗黑鳃金龟气味结合蛋白 HparOBP15a 基因的克隆及功能分析. 昆虫学报, 59(3): 260-268]

Feng L, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a Lepidoptera general odorant binding protein. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 27(5): 405-412.

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Liu Y, Xia QY, Xiang ZH, 2007. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 37(3): 266-277.

Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, Mckinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*., 12(9): 1357-1369.

Hu P, Wang JZ, Cui MM, Tao J, Luo YQ, 2016. Antennal transcriptome analysis of the Asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis*. *Sci. Rep*., 6: 26652.

Jiang QY, Wang WX, Zhang ZD, Zhang L, 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 39(7): 440-447.

Jin YJ, Li JQ, Li JG, Luo YQ, Teale SA, 2004. Olfactory response of *Anoplophora glabripennis* to volatile compounds from Ash-leaf Maple (*Acer negundo*) under drought stress. *Sci. Silv. Sin*., 40(1): 99-105. [金幼菊, 李继泉, 李建光, 骆有庆, Teale SA, 2004. 光肩星天牛对干旱胁迫下复叶槭挥发物的嗅觉反应. 林业科学, 40(1): 99-105]

Justice RW, Biessmann H, Walter MF, Dimitratos SD, Woods DF, 2003. Genomics spawns novel approaches to mosquito control. *BioEssays*, 25(10): 1011-1020.

Laue M, Steinbrecht R, Ziegelberger G, 1994. Immunocytochemical localization of general odorant binding protein in olfactory sensilla of the silk moth *Antheraea polyphemus*. *Naturwissenschaften*, 81(4):

178 – 180.

Li GH, Gao RT, Smith MT, Kong LC, 2010. Study on dispersal of *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) (Coleoptera: Cerambycidae) population. *Forest Res.*, 23(5): 678 – 684. [李国宏, 高瑞桐, Smith MT, 孔令才, 2010. 光肩星天牛种群扩散规律的研究. 林业科学研究, 23(5): 678 – 684]

Li GW, Chen XL, Li BL, Zhang GH, Li YP, Wu JX, 2016a. Binding properties of general odorant binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *PLoS ONE*, 11(5): e0155096.

Li GW, Chen XL, Shang TC, 2017a. Identification and tissue distribution of odorant binding proteins of female antennae *Anoplophora nobilis* Ganglbauer (Coleoptera: Cerambycidae). *Chin. J. Ecol.*, 36(6): 1678 – 1689. [李广伟, 陈秀琳, 尚天翠, 2017a. 黄斑星天牛雌虫触角气味结合蛋白基因的鉴定及组织分布. 生态学杂志, 36(6): 1678 – 1689]

Li GW, Lu Y, Chen XL, Shang TC, 2017b. Extraction and identification of host-plant volatiles of *Acer mono* and EAG responses of *Anoplophora nobilis* to the primary compounds of *A. mono* volatiles. *J. Henan Norm. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 45(2): 53 – 59. [李广伟, 芦屹, 陈秀琳, 尚天翠, 2017b. 五角枫挥发物的提取鉴定及黄斑星天牛对主要组分的触角电位反应. 河南师范大学学报(自然科学版), 45(2): 53 – 58]

Li GW, Zhang Y, Li YP, Wu JX, Xu XL, 2016b. Cloning, expression, and functional of three odorant binding proteins of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 91(2): 67 – 87.

Li S, Gao W, Cheng XC, Zhou YT, Cui WC, 2016. Electroantennogram response of *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) to *Acer negundo* volatiles. *Forest Pest Dis.*, 35(2): 9 – 15. [李硕, 高薇, 程相称, 周艳涛, 崔伟婵, 2016. 光肩星天牛对复叶槭挥发物的触角电位及行为反应. 中国森林病虫, 35(2): 9 – 15]

Li S, Picimbon JF, Ji SD, Kan YC, Qiao CL, Zhou JJ, Pelosi P, 2008. Multiple functions of an odorant binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372(3): 464 – 468.

Li ZQ, He P, Zhang YN, Dong SL, 2017. Molecular and functional characterization of three odorant-binding protein from *Periplaneta americana*. *PLoS ONE*, 12(1): e0170072.

Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Wang SB, Wang CY, Lv LM, Dong SL, Cui JJ, 2015. Identification and expression pattern of candidate olfactory genes in *Chrysoperla sinica* by antennal transcriptome analysis. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 15: 28 – 38.

Manoharan M, Chong MNF, Vaïtinadapoulé A, Frumence E, Sowdhamini R, Offmann B, 2013. Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. *Genome Biol. Evol.*, 5(1): 163 – 180.

Meng PS, Trotter RT, Keena MA, Baker TC, Yan S, Schwartzberg EG, Hoover K, 2014. Effects of pheromone and plant volatile release rates and ratios on trapping *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) in China. *Environ. Entomol.*, 43(5): 1379 – 1388.

Nehme ME, Keena MA, Zhang A, Baker TC, Xu Z, Hoover K, 2010. Evaluating the use of male-produced pheromone components and plant volatiles in two trap designs to monitor *Anoplophora glabripennis*. *Environ. Entomol.*, 39(1): 169 – 176.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658 – 1676.

Qin JM, Cai LJ, Zheng LS, Cheng XJ, You MS, 2016. Identification and ligand binding characteristics of antennal binding protein PxylOBP31 in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(8): 812 – 822. [覃江梅, 蔡立君, 郑丽双, 程小娟, 尤民生, 2016. 小菜蛾触角结合蛋白 PxylOBP31 的鉴定与结合特性分析. 昆虫学报, 59(8): 812 – 822]

Sandler BH, Leal WS, Clardy J, Nikonova L, 2000. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chem. Biol.*, 7(2): 143 – 151.

Thode AB, Kruse SW, Nix JC, Jones DNM, 2008. The role of multiple hydrogen-bonding groups in specific alcohol binding sites in proteins: insights from structural studies of LUSH. *J. Mol. Biol.*, 376(5): 1360 – 1376.

Tsitsanou KE, Thireou T, Drakou CE, Koussis K, Keramioti MV, Leonidas DD, Eliopoulos E, Iatrou K, Zographos SE, 2012. *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. *Cell Mol. Life Sci.*, 69(2): 283 – 297.

Vandermoten S, Francis F, Haubruge E, Leal WS, 2011. Conserved odorant-binding proteins from aphids and eavesdropping predators. *PLoS ONE*, 6(8): e23608.

Vogt RG, Rybczynski R, Lerner MR, 1991. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.*, 11(10): 2972 – 2984.

Wang JZ, Hu P, Luo YQ, Tao J, 2017. Identification and expression patterns of the pheromone binding protein genes *AglaPBP*1 and *AglaPBP*2 in *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 54(1): 45 – 55. [王菁桢, 胡平, 骆有庆, 陶静, 2017. 光肩星天牛性信息素结合蛋白 *AglaPBP*1 和 *AglaPBP*2 基因鉴定和表达分析. 应用昆虫学报, 54(1): 45 – 55]

Wang ZW, Xu HC, Zhang WW, Wang PX, 2016. *Anoplophora glabripennis* host plant selection with main host plant volatile chemical component analysis. *J. Zhejiang A&F Univ.*, 33(4): 558 – 563. [王紫薇, 徐华潮, 张娓娓, 王佩星, 2016. 光肩星天牛对寄主的选择及主要寄主挥发物的化学成分分析. 浙江农林大学学报, 33(4): 558 – 563]

Yan XF, Li XJ, Luo YQ, Xu ZC, Tian GF, Zhang TL, 2008. Oviposition preference of *Anoplophora glabripennis* emerging from five host tree species under field conditions. *For. Stud. China*, 10(1): 23 – 26.

Yin J, Feng HL, Sun HY, Xi JH, Cao YZ, Li KB, 2012. Functional

analysis of general odorant binding protein 2 from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *PLoS ONE*, 7(3): e33589.

Yu F, Zhang SA, Zhang L, Pelosi P, 2009. Intriguing similarities between two novel odorant-binding proteins of locusts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385(5): 369-374.

Zhang AJ, Oliver JE, Chauhan K, Zhao BG, Xia LQ, Xu ZC, 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Naturwissenschaften*, 90(9): 410-413.

Zhou JJ, Zhang GA, Huang W, Birkett MA, Field LM, Pickett JA, Pelosi P, 2004. Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Lett.*, 558(1): 23-26.

Zhu N, Zhang DY, Wu LP, Hu Q, Fan JT, 2017. Attractiveness of aggregation pheromones and host plant volatiles to *Anoplophora glabripennis* and *A. chinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(4): 421-430. [朱宁, 张冬勇, 吴利平, 胡琴, 樊建庭, 2017. 聚集信息素和寄主植物挥发物对光肩星天牛和星天牛的引诱作用. 昆虫学报, 60(4): 421-430]

(责任编辑: 马丽萍)